



TITLE:

Construction of an efficient degradation system for cellulosic biomass(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Bae, Jungu

CITATION:

Bae, Jungu. Construction of an efficient degradation system for cellulosic biomass. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19041>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	裴 峻九
論文題目	Construction of an efficient degradation system for cellulosic biomass （セルロースバイオマスの高効率分解系の構築）		
（論文内容の要旨）			
<p>近年、石油依存型社会からの脱却が求められており、再生エネルギー開発の様々な研究が行われている。その中でも、バイオエタノールは液体燃料であり、車の内燃機関などの現在のインフラでもすぐに活用できるという点で特に期待されている。そういうエネルギーの原料として、比較的利用が簡単な穀物系バイオマスは、食糧価格が高騰するなど多くの問題が発生しているため、その代案としてセルロースバイオマスを原料とする研究が注目されている。</p> <p>セルロースバイオマスの主な炭素源であるセルロースは、結晶構造をとっているため、分解効率が低いという問題点がある。また、現状のバイオエタノール生産プロセスが多段階からなっているため、生産設備及びその運用コストが高くなってしまい、多段階反応のため途中で他の微生物汚染が起こる可能性が高くなる。そこで、本研究では、上記の問題を改善するために、まずバイオマス分解微生物の分解戦略を分析すること、さらにその分解戦略を活用して、セルラーゼ間の近接効果を利用した統合型プロセス（Consolidated bioprocessing, CBP）を実現できるセルロース分解系の構築を試みた。</p> <p>1. <i>Clostridium cellulovorans</i>の多様な基質での定量プロテオーム解析</p> <p>ソフトバイオマス高効率分解微生物の1種である<i>C. cellulovorans</i>は、基質によって生産する酵素の種類を変え、バイオマス分解酵素の複合体であるセルロソームを生産することでバイオマスを効率よく分解できる。これまで、この微生物による酵素の生産パターンが、基質によってどう変化するかを調べた研究はいくつかあるが、そのほとんどがセルロソームだけに限られていた。しかし、<i>C. cellulovorans</i>は、セルロソームだけでなく、足場を持たず複合体を形成しない多くのノンセルロソーマル酵素を持つことがゲノム解読研究から判明したので、ノンセルロソーマル酵素の影響も無視できないと予想される。そこで、<i>C. cellulovorans</i>の培養上清を精製過程を経ずに直接LC-MS/MSを用いたプロテオーム解析に供し、セルロソーマル酵素やノンセルロソーマル酵素の同時分析を行うことで、自然界における微生物の分解戦略を理解しようと試みた。</p> <p>培養上清には多くの酵素が含まれており、MS/MSのイオン化抑制現象により酵素の同定数が減るという問題があった。本プロテオーム解析には、分離能を上げイオン化抑制現象を抑えるために、当研究室が開発してきたキャピラリーシリカのロングモノリスカラム（480 cm）を装着したLC-MS/MSを用いた。</p> <p>セロビオースやキシロース、ペクチン、リン酸膨潤セルロース（PASC）を唯一の炭素源とする培地で12日間培養し、それぞれの培養上清の定量プロテオーム解析を行った結果、バイオマス分解関連酵素が79種類同定された。そこで、それぞれの基質で特異的に多く生産された酵素を調べたところ、それぞれを特異的に分解する酵素群が主に生産されていることが確認できた。また、同定された基質特異的酵素</p>			

数の約8割がノンセルロソーマル酵素であることが分かり、ノンセルロソーマル酵素もバイオマスの分解に重要であることが判明した。しかし、基質特異的酵素は、基質によってその発現量の変動が大きい酵素であって、その発現量自体が多いとは限らない。発現量を見るために、スペクトルカウント法により全体的なタンパク質の生産量を比較した結果、セルロソーマル酵素の方がノンセルロソーマル酵素より約3倍多く生産されていることが分かった。

従って、基本的な戦略としてセルロソームをベースとして、ノンセルロソーマル酵素群を基質によって変化させることで、バイオマス分解を最適化していることが判明した。

2. セルラーゼ間の近接効果

プロテオーム解析の結果、*C. cellulovorans*が主にセルロソームを生産していたことから分かるように、セルラーゼがセルロソームの足場に集約されることによる近接効果はセルロース分解に非常に重要である。しかし、セルロソームをそのまま酵母で再構築するには、足場タンパク質の分子量が大きく、その発現量が低くなるという問題がある。そこで、酵母細胞表層工学により、セルラーゼを酵母の表層に直接共提示・集約することで、CBPを実現できると同時に、近接効果を再現したセルロース分解系を構築できると考えた。

まず、セルロースの完全分解に必須の3種類のセルラーゼ、エンドグルカナーゼ(EG)、セロビオハイドrolラーゼ(CBH)、 β -グルコシダーゼ(BG)を提示したアーミング酵母を作製した。3種類のセルラーゼを提示させることで、セルロースをグルコースまで分解し、酵母で直接にエタノール発酵までできる系となる。

近接効果を証明するために、3種類のセルラーゼを一つの酵母細胞壁上に同時に提示したアーミング酵母(ALL酵母)と1種類のセルラーゼを個々に提示した酵母を混合したサンプル(MIX酵母)のセルロース分解活性を比較した。その結果、ALL酵母の方がOD10の細胞濃度で反応させた場合は1.25倍、OD0.1では2.22倍高い活性を示した。ALL酵母の場合は酵母の濃度が変わっても異なる種類の酵素間の距離は変わらないが、MIX酵母の場合は酵母の濃度が低くなると異なる種類の酵素間の距離が遠くなる。ALL酵母とMIX酵母間のPASC分解活性の差はOD0.1で確かに大きくなっていった。これらの結果を元に、酵素間の距離と相対的なPASC分解活性をみると、距離が近い範囲でその活性がより急激に上昇する、すなわち近接効果がより高くなることが分かった。基質としては、PASCだけでなく、結晶性セルロースであるAvicelでも近接効果があることが確認できた。

以上の結果から、アーミング酵母はCBPを実現できるだけでなく、近接効果によりセルロースをより高効率に分解できる系であることが明らかになった。提示量を上げ酵素間の距離をさらに近くすることで、より高活性のCBP用のアーミング酵母の構築が可能であることが分かった。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

次世代エネルギー源として注目されているセルロースバイオマスは難分解性であり、その分解効率を上げ、エタノールの生産プロセスを統合することはバイオエタノールの実用化のための重要な課題である。そのために、ソフトバイオマスを効率よく分解する微生物*Clostridium cellulovorans*の分解戦略を定量プロテオーム解析により調べ、その分解戦略を活用してセルラーゼ間の近接効果を酵母上に再現することを試みた。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. *C. cellulovorans*は基質によって生産する酵素群を変化させる特徴がある。モノリスカラム装着LC-MS/MSを用いることで、セルロソームやノンセルロソーム酵素の同時定量プロテオーム解析に成功し、用いた基質の分解に最適な酵素群を特定できた。基本的には、セルロソームをベースにして、基質によって異なる種類のノンセルロソーム酵素を生産することで、バイオマスの分解を最適化できることが判明した。
2. 3種類のセルラーゼを共提示しているアーミング酵母と、1種類のセルラーゼのみを個々に提示した酵母を用いて、サンプルのPASCやAvicelの分解活性を比較することで、アーミング酵母におけるセルラーゼ間の近接効果を証明することに成功した。アーミング酵母の提示量を上げることで、セルラーゼ間の距離はさらに近くなり、近接効果がもっと高まり、これにより、セルロース分解活性の高い酵母生体触媒を作製できることが分かった。

以上のように、本論文は、セルロソームやノンセルロソーム酵素を含む *C. cellulovorans* の培養上清を精製せずに網羅的に解析し、自然界での微生物の真の分解戦略を評価することに成功した。また、3種類のセルラーゼを酵母上に提示させることで、足場タンパク質なしでセルロソームの近接効果を酵母上に再現することに成功した。これにより、活性が高く、エタノール生産プロセスも統合できるセルロース分解系を構築することができた。これらの結果は、生体高分子化学、バイオマス変換化学、及び生体触媒化学に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成27年2月5日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)